

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Januar 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/004699 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**,
B01J 19/00

ADELHELM, Karin [DE/DE]; August-Bebel-Strasse 22,
07743 Jena (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07539

(74) **Anwalt: NEUEFEIND, Regina**; Maiwald Patentanwalts
GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Juli 2002 (05.07.2002)

(81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 32 785.4 6. Juli 2001 (06.07.2001) DE

(84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US)**: **CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES
GMBH** [DE/DE]; Löbstedter Strasse 105, 07743 Jena
(DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US)**: **SCHULZ, Torsten**
[DE/DE]; August-Bebel-Strasse 22, 07743 Jena (DE).
ERMANTRAUT, Eugen [DE/DE]; Forstweg 23, 07745
Jena (DE). **POSER, Siegfried** [DE/DE]; Am Steinborn 2a,
07749 Jena (DE). **KAISER, Thomas** [DE/DE]; Talstrasse
73, 07743 Jena (DE). **MÖBIUS, Klaus-Peter** [DE/DE];
Dorfstrasse 29a, 07751 Zöllnitz (DE). **ULLRICH,
Thomas** [DE/DE]; Erfurter Strasse 32, 07743 Jena (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title**: METHOD FOR IDENTIFYING NUCLEIC ACID MOLECULES AMPLIFIED IN A POLYMERASE CHAIN REAC-
TION

(54) **Bezeichnung**: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON IN EINER POLYMERASE-KETTENREAKTION AMPLIFIZIER-
TEN NUKLEINSÄUREMOLEKÜLEN

(57) **Abstract**: The invention relates to a device and method for qualitatively and/or quantitatively identifying nucleic acid molecules
that are amplified in a polymerase chain reaction.

(57) **Zusammenfassung**: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nach-
weis von in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Nukleinsäuremolekülen.

WO 03/004699 A2

Verfahren zum Nachweis von in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten
Nukleinsäuremolekülen

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Nukleinsäuremolekülen.

- 10 Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) wird durch repetitives Wiederholen eines Temperaturregimes ein DNA-Template exponentiell und sequenzspezifisch vervielfältigt (siehe u.a. US 4,683,195, US 4,683,202, US 4,965,188, EP 0502588, M.J. McPherson, D.D. Hames, G.R. Taylor, PCR 1 und 2: A practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford (1995)). Bei der
- 15 Denaturierungstemperatur wird die zu amplifizierende DNA zu einzelsträngiger DNA aufgeschmolzen. Bei der folgenden niedrigeren Annealingtemperatur binden die Primer an die beiden DNA-Einzelstränge. Es folgt die etwas höhere Extensionstemperatur, bei der die beiden DNA-Einzelstränge durch eine Enzym-katalysierte Reaktion zu Doppelsträngen aufgefüllt werden. Der Zyklus wird nahezu
- 20 beliebig oft wiederholt, bis die amplifizierte DNA, das PCR-Produkt, in analytisch verwertbarer Menge vorliegt. Die PCR ist eines der wichtigsten Verfahren in der DNA-Analytik und besitzt deswegen eine ausgesprochen hohe wirtschaftliche Bedeutung.

- 25 Ein wesentliches Problem bei der PCR stellt die Bestimmung der Anzahl an PCR-Zyklen dar, die zur Amplifikation einer gewünschten, ggf. analytisch verwertbaren Menge an Nukleinsäure erforderlich ist. Beispielsweise können zu diesem Zweck Farbstoffe eingesetzt werden, die sich in doppelsträngige DNA interkalieren oder an doppelsträngige DNA anlagern und somit das PCR-Produkt sichtbar machen.

30

In F. Lottspeich, H. Zorbas, „Bioanalytik“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1998), ist u.a. der Farbstoff SYBR Green beschrieben, der sich spezifisch – einem Interkalator vergleichbar – ausschließlich an doppelsträngiger

- 2 -

DNA anlagert. Durch die Anlagerung wird der Farbstoff fluoreszenzaktiv. Der Farbstoff wird der PCR zugesetzt. Durch die Zunahme des gemessenen Fluoreszenzlichts bei der Extensionstemperatur wird die Bildung von doppelsträngiger DNA angezeigt. Ferner kann bei dieser Methode nach Beendigung der PCR durch Erhitzen der Probe auf 95°C die Temperatur bestimmt werden, bei der das Fluoreszenzlicht durch den DNA-Aufschmelzprozess verschwindet. Auf diese Weise kann auf den GC-Gehalt eines PCR-Produktes geschlossen werden. Schließlich eignet sich diese Methode nach einer Kalibrierung zur Konzentrationsbestimmung des Templates, d.h. der Ausgangskonzentration der zu amplifizierenden Nukleinsäure.

In WO 97/29210 und US 5,716,784 ist ein sog. Taqman-Verfahren beschrieben, das eine in situ- und sequenzspezifische Detektion von PCR-Produkten ermöglicht. Bei dem Taqman-Verfahren werden Primer eingesetzt, die zwei Fluoreszenzfarbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander tragen. Dadurch überträgt der angeregte Farbstoff durch Resonanztransfer seine ‚Energie‘ auf den zweiten Farbstoff, der rotverschoben das Fluoreszenzlicht aussendet. Wird der Primer durch die Taq-Polymerase eingebaut, so verliert er durch die Endonukleaseaktivität der Polymerase den zweiten Farbstoff, so dass das ausgesendete Fluoreszenzlicht blauverschoben ist. Durch diese Fluoreszenzlichtverschiebung wird das PCR-Produkt detektiert. Nach einer Kalibrierung eignet sich diese Methode ebenfalls zur Konzentrationsbestimmung des Templates.

Ferner sind von der Fa. Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim sog. Hybridization Probes beschrieben. Derartige Hybridization Probes sind hybridisierungsfähige Oligonukleotide, die an ihren Enden zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe tragen, die in Fluoreszenzenergie-Resonanztransfer (FRET) treten können. Die Hybridization Probes werden so gewählt, dass sie auf dem PCR-Produkt nebeneinander hybridisieren, und dadurch eine Rotverschiebung des Fluoreszenzlichtes durch den Energieresonanztransfer der

- 3 -

beiden nebeneinanderliegenden Farbstoffe einsetzt. Diese Farbverschiebung wird gemessen, um das PCR-Produkt zu detektieren. Ein wesentlicher Nachteil der Methode ist, dass die Konsensussequenz des PCR-Produktes bekannt sein muss. Diese Methode eignet sich ebenfalls nach einer Kalibrierung zur

5 Konzentrationsbestimmung des Templates.

Nachteilig an den vorstehend beschriebenen Verfahren ist, dass für den Nachweis der in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Nukleinsäuremoleküle eine Markierung der PCR-Produkte erforderlich ist. Ein weiterer Nachteil der Verfahren

10 des Stands der Technik ist, dass üblicherweise zur Bestimmung des Molekulargewichts der PCR-Produkte eine zeitaufwendige elektrophoretische Aufarbeitung der PCR-Produkte erforderlich ist.

Es besteht daher ein Bedarf an alternativen Nachweisverfahren für amplifizierte

15 Nukleinsäuremoleküle, bei denen auf eine Markierung der PCR-Produkte verzichtet werden kann, und die gleichzeitig eine Detektion der PCR-Produkte in situ während der PCR ermöglichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es somit, ein Verfahren bereitzustellen, mit

20 dem in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierte Nukleinsäuremoleküle qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen werden können, ohne dass eine Markierung der PCR-Produkte beispielsweise mit Färbemethoden oder eine elektrophoretische Aufarbeitung der PCR-Produkte erforderlich ist.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem das Molekulargewicht von in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Nukleinsäuremolekülen bestimmt werden kann, ohne

25 dass eine elektrophoretische Aufarbeitung der PCR-Produkte erforderlich ist.

- 4 -

Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, dass der Nachweis der PCR-Produkte in situ während der PCR möglich ist, um eine Optimierung der PCR-Dauer auf die für die gewünschte Menge an PCR-Produkt ausreichende Zahl an Amplifikations-Zyklen zu erreichen.

5

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens, das die Ermittlung der Ausgangskonzentration des Templates ermöglicht.

10 Weitere Aufgaben ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung.

Die Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

15 Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, dass in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierte Nukleinsäuremoleküle qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen werden können, indem die Änderung der Masse an Oligonukleotiden in einer Amplifikationslösung im Verlauf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) detektiert wird.

20

Die in einer Amplifikationslösung vorliegenden Oligonukleotide sind die zu amplifizierenden Template-Nukleinsäuremoleküle, die amplifizierten Nukleinsäuremoleküle sowie die eingesetzten Oligonukleotidprimer. Die zu amplifizierenden Template-Nukleinsäuremoleküle und die amplifizierten

25 Nukleinsäuremoleküle werden im Folgenden auch unter dem Begriff Target-DNA zusammengefasst.

Im Folgenden werden einige Begriffe erläutert, die zur Beschreibung der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

30

- 5 -

Unter SMO wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Sensorsystem zum Molekulargewichts-spezifischen Nachweis von Oligonukleotiden bezeichnet.

5 Unter SMO-PCR wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Sensorsystem zum Molekulargewichts-spezifischen Nachweis von Oligonukleotiden während der PCR verstanden.

Eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) umfasst im Rahmen der vorliegenden Erfindung üblicherweise etwa 10 bis 50 oder mehr PCR-
10 Zyklen, vorzugsweise etwa 20 bis 40 PCR-Zyklen, besonders bevorzugt etwa 30 Zyklen.

Als PCR-Zyklus wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein einzelner Verstärkungsschritt der PCR bezeichnet.
15

Als PCR-Produkt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Produkt aus der Verstärkung bzw. Vervielfältigung der zu amplifizierenden Nukleinsäuremoleküle durch die PCR bezeichnet.

20 Als Oligonukleotidprimer bzw. Primer wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Oligonukleotid bezeichnet, das an die Target-DNA bindet bzw. hybridisiert, wobei von der Bindungsstelle die Synthese des Gegenstranges der Target-DNA bei der PCR startet.

25 Unter Target bzw. Target-DNA wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die DNA verstanden, die bei der PCR kopiert wird.

Unter Template bzw. Template-DNA wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die DNA verstanden, die durch die PCR verstärkt bzw. amplifiziert werden soll.

- 6 -

Unter Amplifikationslösung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Reaktionsgemisch verstanden, mit dem die PCR durchgeführt wird.

- Die Bezeichnung dNTP steht im Rahmen der vorliegenden Erfindung für
- 5 Desoxyribonukleotidtriphosphat, das Monomer, das als Edukt für die PCR benötigt wird.

Die Bezeichnungen A, G, C und T stehen für Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin.

- 10 Als Oligonukleotid wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Polymer aus Desoxyribonukleotidtriphosphaten bezeichnet.

Als Probenlösung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die zu analysierende Flüssigkeit mit den zu amplifizierenden Nukleinsäuremolekülen bezeichnet.

15

Unter der Denaturierungstemperatur wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Temperatur verstanden, bei der die doppelsträngige DNA im PCR-Zyklus aufgetrennt wird. Die Denaturierungstemperatur beträgt üblicherweise mehr als 90°C, vorzugsweise etwa 95°C.

20

Unter der Annealingtemperatur wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Temperatur verstanden, bei der die Primer an das Target hybridisieren. Die Annealingtemperatur liegt üblicherweise im Bereich von 60°C bis 70°C und beträgt vorzugsweise etwa 65°C.

25

Unter der Kettenverlängerungs- bzw. Extensionstemperatur wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Temperatur verstanden, bei der die DNA durch Einbau der Monomerbausteine synthetisiert wird. Die Extensionstemperatur liegt üblicherweise im Bereich von etwa 70°C bis etwa 75°C und beträgt vorzugsweise

30 etwa 72°C.

- 7 -

Unter Hybridisierung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Assoziation zweier einzelsträngiger DNA-Fragmente zu einem Doppelstrang verstanden. Dabei findet die Assoziation vorzugsweise immer zu Paaren von A und T bzw. G und C
5 statt.

Unter einer Universaloligonukleotid-Sensorfläche (UvOS-Fläche) wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Oberfläche verstanden, auf der sämtliche kombinatorisch erzeugbaren Oligonukleotide mit einer definierten Länge gleich
10 verteilt gebunden sind.

Als Detektionsphase wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Phase bezeichnet, in der die Bestimmung der Massenänderung der Oligonukleotide während der PCR stattfindet.
15

Als Amplifikationsphase wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Phase bezeichnet, in der die PCR stattfindet.

Die Erfindung beruht auf der Tatsache, dass sich bei jedem PCR-Zyklus die Masse, aber nicht die Menge an Oligonukleotiden vergrößert. Dies wird im Folgenden an
20 einem Beispiel ausgehend von der Amplifikation eines einzelsträngigen Produkts erläutert. Zu Beginn einer PCR befinden sich beispielsweise 10 μmol Oligonukleotidprimer und 1 μmol Template-Nukleinsäuremolekül in der Amplifikationslösung. Nach zwei PCR-Zyklen befinden sich bei einer idealen PCR
25 mit einem Verstärkungsfaktor von 2 in der Lösung 4 μmol Produkt und, da Primer zur Amplifikation verbraucht wurden, 7 μmol Primer. Da die Masse der Primer in der Regel nur etwa 1/10 des Produktes beträgt, nimmt die Masse an Oligonukleotiden, umfassend die Masse an Target-DNA und die Masse an Oligonukleotidprimern, nach zwei Zyklen in diesem Beispiel um etwa das 2,4-fache
30 zu. Beträgt die Konzentration an Primern zu Beginn der PCR das 100-fache der

- 8 -

Konzentration an Template-Nukleinsäure, würde bei diesem Beispiel die Gesamtmasse an Oligonukleotiden nach zwei PCR-Zyklen um den Faktor 1,03 zunehmen. Die Massenzunahme entsteht jeweils durch den Einbau an Desoxyribonukleotidtriphosphat-Monomeren (dNTP), die zur Synthese des PCR-Produkts dienen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Nukleinsäuremolekülen, bei dem die Änderung der Masse an Oligonukleotiden in einer Amplifikationslösung, umfassend die Masse an Target-DNA und ggf. die Masse an Oligonukleotidprimern, während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt wird.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass für den Nachweis der PCR-Produkte im Gegensatz zu allen bislang bekannten Verfahren eine Markierung der amplifizierten Nukleinsäuremoleküle beispielsweise durch Färbemethoden nicht erforderlich ist, sondern der Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation während der Amplifikationsreaktion allein über die Masse der gebildeten PCR-Produkte erfolgt. Daraus ergibt sich, dass die bei den Nachweisverfahren des Standes der Technik anfallenden Kosten insbesondere für Farbstoffe wie beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe bei dem erfindungsgemäßen Verfahren entfallen. So können beispielsweise die Kosten für die speziellen bei dem Taqman-Verfahren eingesetzten fluoreszenzmarkierten Primer, die zwei Fluoreszenzfarbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander tragen, eingespart werden.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass eine Polymerase-Kettenreaktion, bei der Markierungsmethoden, beispielsweise in Form von Färbemethoden, zum Nachweis der amplifizierten Nukleinsäuremoleküle überflüssig sind, wesentlich robuster, d.h. mit einem geringeren Risiko eines Reaktionsabbruchs und/oder mit einem höheren Verstärkungsfaktor, abläuft.

Es versteht sich für den Fachmann, dass das erfindungsgemäße Nachweisverfahren nicht auf den Einsatz bei PCR-Reaktionen beschränkt ist. Vielmehr kann die Erfindung auch auf andere Amplifikationsreaktionen angewendet werden.

- 5 Beispielhaft seien hier genannt die sog. IDA-Reaktion (siehe DE 197 41 714), die Ligase-Kettenreaktion (LCR-Methode), die P&LCR, die 3SR-Reaktion (self-sustained sequence replication), die NASBA-Methode (nucleic acid sequence based amplification), die SDA-Reaktion (strand displacement amplification). Es ist klar, dass sich das erfindungsgemäße Nachweisverfahren für alle Reaktionen eignet, während deren Verlauf Nukleinsäuremoleküle amplifiziert werden, also die
10 Änderung der Masse an Nukleinsäuren eine Aussage über den Amplifikationserfolg zulässt.

- Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung der Änderung der Masse an Oligonukleotiden während der PCR durch Bestimmung der Masse an bei einem PCR-Zyklus
15 vorliegenden Oligonukleotiden bei mindestens zwei PCR-Zyklen. Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-Zyklus vorliegenden Oligonukleotiden bei jedem PCR-Zyklus. Alternativ kann die Masse an Oligonukleotiden in der Amplifikationslösung bzw. PCR-Reaktionslösung aber auch
20 bei jedem zweiten Zyklus oder jedem dritten Zyklus oder in beliebigen anderen Intervallen bestimmt werden. Um eine Änderung der Masse an Oligonukleotiden während der PCR zu bestimmen, ist es allerdings erforderlich, dass die Masse an Oligonukleotiden bei mindestens zwei Zyklen der PCR bestimmt wird.

- 25 Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird spezifisch die Zunahme der Masse an amplifizierten Nukleinsäuremolekülen ohne Berücksichtigung der Masse an Oligonukleotidprimern während der PCR bestimmt. Alternativ ist es jedoch ebenso vorteilhaft, die Änderung der Gesamtmasse an Oligonukleotiden, d.h. die Masse an DNA, die bei der PCR kopiert wird und die
30 Masse an Oligonukleotidprimern, während der PCR zu bestimmen.

- 10 -

Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-Zyklus vorliegenden Oligonukleotiden durch Bestimmung der Masse an Oligonukleotiden, die an eine Oberfläche binden. Besonders bevorzugt wird bei dem

5 erfindungsgemäßen Verfahren eine Oberfläche verwendet, die PCR-Produkt und Primer mit in etwa gleicher Affinität bindet. Es kann allerdings ebenfalls bevorzugt sein, dass eine Oberfläche verwendet wird, die bevorzugt die Target-DNA bindet. Bei beiden Alternativen ist es vorteilhaft, wenn die bei der PCR als Monomer-Bausteine eingesetzten Desoxyribonukleotidtriphosphate nicht an die Oberfläche

10 binden. Ferner ist es bevorzugt, dass die Bindung der Oligonukleotide an die Oberfläche reversibel erfolgt.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Bestimmung der Änderung der Masse an Oligonukleotiden in

15 situ, d.h. in der Reaktionskammer, in der auch die PCR abläuft. Auf diese Weise kann die für eine gewünschte Menge an Target-DNA erforderliche Anzahl an PCR-Zyklen online bestimmt werden. Wird beispielsweise die Bildung der gewünschten Menge an Target-DNA detektiert, kann die PCR automatisch abgebrochen werden. Somit kann die Zyklenzahl bei der PCR durch das erfindungsgemäße Verfahren auf

20 die für die Menge an Target-DNA ausreichende Anzahl an Zyklen beschränkt werden. Diese in situ-Optimierung der Reaktionsdauer erlaubt eine Zeit- und Kostenersparnis.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden nach jedem

25 Amplifikationsschritt auf der Oberfläche vorliegende Bindungsstellen mit einem Oligonukleotid abgesättigt. Da die Masse bei gleicher Molzahl an Oligonukleotiden mit jedem PCR-Zyklus zunimmt, nimmt auch die an der Oberfläche gebundene Masse mit jedem PCR-Zyklus zu.

- 11 -

Die Bestimmung der Änderung der Masse an Oligonukleotiden während der PCR erfolgt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise durch einen massensensitiven Detektor. Als massensensitiver Detektor kann beispielsweise ein Transducer verwendet werden, der eine Massenänderung auf einer Oberfläche in ein
5 elektrisches oder optisches Signal wandelt. Als Detektionsverfahren können allgemein im Rahmen der vorliegenden Erfindung solche Verfahren eingesetzt werden, die sensitiv auf eine Massenänderung auf einem Oberflächenfilm reagieren. Es ist allerdings nicht erforderlich, dass die Messgröße die Massenänderung selbst ist. So können auch alle von der Masse abhängigen Messgrößen wie z.B. Brechungs-
10 index, Dichteänderung, Schichtdickenänderung und Kompressibilität sowie deren Kombinationen zur Bestimmung der Änderung der Masse an Oligonukleotiden bei dem vorliegenden Verfahren herangezogen werden.

Folgende Detektoren bzw. Transducer werden besonders bevorzugt bei dem
15 erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt:

- Oberflächenwellensensoren bzw. Surface Acoustic Wave (SAW)-Sensoren, bei denen rückgekoppelt die Eigenschwingung der Sensorfläche gemessen wird, die in starkem Maße von ihrer Masse abhängt (N. Barie, M. Rapp, H. J. Ache, UV crosslinked polysiloxanes as new coating materials for SAW
20 devices with high long-term stability, Sensors and Actuators B, 46(1998) S.97-103).
- Mikrowaagen auf der Basis eines Schwingquarzes, der seine Eigenfrequenz mit der Oberflächenbeladung ändert (G. Schwedt; Analytische Chemie : Grundlagen, Methoden und Praxis; Stuttgart [u.a.] : Thieme, 1995).
- Sensoren basierend auf Quartz Crystal Microbalance Dissipation, einem auf der Basis von Mikrowaagen erweiterten Verfahren, welches die Dämpfung

- 12 -

der Quarzschwingung zusätzlich ausnützt (Fa. Q-Sense, Göteborg, Schweden).

- Detektoren basierend auf interferometrischen Verfahren, bei denen
5 Brechungsindex und Schichtdickenänderungen gemessen werden.

Ein besonders bevorzugtes interferometrisches Verfahren ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Weißlichtinterferometrie (W. Nebe, Analytische Interferometrie, Leipzig : Akad. Verl.-Ges., 1970), die im Falle der
10 analytischen Messung von Schichtdickenänderungen auch als RIFS (Reflectometric Interference Spectroscopy) bezeichnet wird (G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm; Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers; Sensors and Actuators B, 11 (1993) 21-27).

- Detektoren zur Bestimmung von Oberflächenplasmonenresonanz.
15

Bei der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (Surface Plasmonen Resonance Spectroscopy, SPR) wird die Winkelabhängigkeit der Reflexionsintensität z.B. an dem Grenzflächensystem Glas-Gold-Sensorfläche-Amplifikationslösung gemessen (I. Stemmler, A. Brecht, G. Gauglitz; Compact SPR-transducers with spectral readout for biosensing applications; Sens. Actuators B 54, 98 - 105 (1999)). Die
20 Plasmonenresonanzfrequenz hängt in hohem Maße von der Dichte der Sensorfläche ab. Mit der Änderung der Plasmonenresonanzfrequenz ändert sich auch die Reflexionsintensität.
25

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Schritte:

- 13 -

- a) Denaturierung von DNA-Doppelsträngen durch Einstellung einer geeigneten Temperatur (Denaturierungstemperatur);
- b) Annealing der Oligonukleotidprimer an die zu amplifizierenden Nukleinsäuremoleküle durch Einstellung einer geeigneten Temperatur
5 (Annealingtemperatur);
- c) DNA-Synthese bzw. Kettenverlängerung bei einer geeigneten Temperatur (Kettenverlängerungstemperatur);
- d) ggf. Wiederholung der Schritte a) bis c),
wobei die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-Zyklus vorliegenden
10 Oligonukleotiden nach Schritt b) und/oder nach Schritt c) erfolgen kann.

Bei der PCR werden für jeden PCR-Zyklus herkömmlicherweise drei Temperaturen durchfahren. Vorzugsweise lösen sich die an der Oberfläche gebundenen Oligonukleotide bei der höchsten Temperatur, d.h. der Denaturierungstemperatur von
15 der Oberfläche ab. Ein bevorzugter Wert für die Denaturierungstemperatur beträgt 95°C. Somit kann bei dieser Denaturierungstemperatur ein Messwert bestimmt werden, der als Nullwert bzw. Bezugswert für die bei dem jeweiligen PCR-Zyklus bestimmte Masse an Oligonukleotiden dient.

- 20 Bei der im PCR-Zyklus nachfolgenden Temperatur, der Annealingtemperatur von beispielsweise etwa 65°C, werden die Oligonukleotide wieder vollständig von der Oberfläche, beispielsweise der Sensorfläche, adsorbiert. Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt deswegen die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-Zyklus vorliegenden Oligonukleotiden bei der Annealing-
25 Temperatur.

Um die Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens zu erhöhen, kann es ferner vorteilhaft sein, die Temperatur unter die Annealingtemperatur zu senken, so dass die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-Zyklus vorliegenden
30 Oligonukleotiden bevorzugt bei einer Temperatur unterhalb der Annealing-

- 14 -

Temperatur erfolgt. Beispielsweise kann die Massenbestimmung bei einer Temperatur im Bereich von 25°C bis 50°C und vorzugsweise im Bereich von 30°C bis 40°C erfolgen.

- 5 Wird von dem bei der bzw. unterhalb der Annealing-Temperatur erhaltenen Messwert der bei der Denaturierungstemperatur bestimmte Nullwert bzw. Bezugswert abgezogen, so erhält man ein von Störeinflüssen freies Messergebnis, in dem Schwankungen und Drift eliminiert sind. Dieses Ergebnis ist bei Verwendung von geeigneten massensensitiven Messverfahren proportional zur Masse mc_n an
- 10 Oligonukleotiden nach n Zyklen. Das Ergebnis eines derartigen Nachweisverfahrens ist in Abbildung 1 dargestellt.

- Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird aus der Änderung der Masse an Oligonukleotiden während der PCR
- 15 das Molekulargewicht der amplifizierten Nukleinsäuremoleküle und/oder der Verstärkungsfaktor der Polymerase-Kettenreaktion bestimmt.

- Die Bestimmung des Molekulargewichts der amplifizierten Nukleinsäuremoleküle und/oder des Verstärkungsfaktors der PCR erfolgt über die im Folgenden
- 20 angegebenen Gleichungen. Dabei steht M für das Messergebnis, das sich beispielsweise bei der Detektion der Massenänderung durch Weißlicht-Interferometrie aus dem Produkt von Brechungsindexdifferenz Δn und Schichtdickenänderung Δd ergibt. cp_n steht für die Primerkonzentration nach n Zyklen, während ct_n für die Targetkonzentration nach n Zyklen steht. n gibt die
- 25 Zyklenanzahl der PCR an und v bezeichnet den Verstärkungsfaktor der PCR. mc_n gibt die Masse an Oligonukleotiden nach n Zyklen an. l_p und l_t stehen für die Länge der Primer bzw. die Länge des Targets und PCR-Produktes der PCR in Anzahl der Basen, während MB für das mittlere Molgewicht der vier Basen steht, das mit 325 g/Mol angesetzt werden kann. Alle folgenden Ableitungen und Konzentrationen
- 30 beziehen sich auf einzelsträngige DNA.

- 15 -

Die Targetkonzentration nach 0 Schritten beträgt: $ct_0 = ct_0 * v^0$

Bei einer idealen PCR beträgt der Vervielfältigungsfaktor $v = 2$. Es findet dann mit
 5 jedem Schritt, d.h. jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der Targetkonzentration
 statt:

Nach dem 1. Schritt beträgt die Targetkonzentration $ct_1 = ct_0 * v$, nach dem 2. Schritt
 $ct_2 = ct_1 * v = ct_0 * v^2$ und nach dem n-ten Schritt $ct_n = ct_0 * v^n$.

10

Bei jedem Schritt, bei dem Target gebildet wird, wird Primer verbraucht und zwar
 mit jedem Targeteinzelstrang ein Primereinzelstrang. Daher beträgt die
 Primerkonzentration nach dem 1. Schritt: $cp_1 = cp_0 - ct_0$, nach dem zweiten Schritt:
 $cp_2 = cp_1 - ct_1 = cp_0 - ct_0 - ct_1 = cp_0 - ct_0 - ct_0 * v$, nach dem dritten Schritt: $cp_3 = cp_2 -$
 15 $ct_2 = cp_0 - ct_0 * (1 - v - v^2)$ und nach dem n-ten Schritt: $cp_n = cp_0 - ct_0 * (1 - v - v^2 -$
 $v^3 \dots v^n)$

Der Klammerausdruck stellt eine geometrische Folge dar. Daher wird cp_n zu:

20 $cp_n = cp_0 - (ct_0 * (v^n - 1) / (v - 1))$

Die Targetlänge l_t , die nach Multiplikation mit dem mittleren Molekulargewicht der
 Basen das Molekulargewicht der Target-DNA ergibt, und der Verstärkungsfaktor v
 lassen sich auf folgende Weise ermitteln:

25

Die Massenkonzentration mc_n an Oligonukleotiden ergibt sich, indem die
 Konzentrationen an Primer mit der Primerlänge l_p und an Target mit der Targetlänge
 l_t multipliziert werden und das Ergebnis mit dem mittleren Molgewicht der Basen
 MB multipliziert wird:

30

- 16 -

$$mc_n = MB * cp_n * lp + MB * ct_n * lt$$

Hierbei macht man die Annahme, dass für die ersten PCR- Schritte (in Abbildung 3 bis etwa Schritt 20) $MB * cp_n * lp$ nahezu konstant bleibt, da der Primerverbrauch zur Gesamtmenge an Primer in der Lösung während der ersten PCR-Schritte bleibt.

Deshalb kann eine Konstante $K = MB * cp_n * lp$ eingeführt werden.

Das Meßsignal M_n hängt von der Gesamtmassenkonzentration über die Systemkonstante E linear ab: $M_n = E * mc_n$

Während der ersten Schritte wird das Signal nur durch die Primer hervorgerufen, da im Vergleich zur Primerkonzentration so gut wie kein Target erzeugt wurde: M_{start} entspricht dann $E * MB * cp_n * lp = K * E$

15

Das gesamte Messsignal ergibt sich aus der Summe von M_{start} und M'_n . $M'_n = E * MB * ct_n * lt = E * MB * ct_0 * v^n * lt$.

20

Da nur v und lt von Interesse sind, wird M_{start} von M_n abgezogen :

$$M'_n = M_n - M_{start}$$

Da als zweiter Messwert neben einem Maß für die Masse an Oligonukleotiden nur die Zyklenanzahl bzw. Schrittzahl n vorliegt und zwischen M'_n und n, bevor eine Sättigungsphase eintritt, ein exponentieller Zusammenhang besteht, werden zur Ermittlung von lt und v die Messwerte M'_n logarithmiert, um anschließend eine lineare Regression durchführen zu können:

30

$$\log(M'_n) = a * n + b = \log(v) * n + \log(E * MB * lt * ct_0)$$

- 17 -

Durch lineare Regression erhält man a und b und dann durch Umformung die gesuchten Werte Targetlänge l_t und Verstärkungsfaktor v .

Die Änderung der Massenkonzentrationen in Abhängigkeit der PCR-Zyklenzahl für
5 ein 500 Basenpaar- und ein 200 Basenpaar-langes Template sind in Abbildung 1 dargestellt.

Der Vorteil der Ermittlung des Molekulargewichts der PCR-Produkte auf die vorstehend beschriebene Weise besteht darin, dass zur
10 Molekulargewichtsbestimmung keine zeitaufwendige elektrophoretische Aufarbeitung der PCR-Produkte im Anschluss an die PCR erforderlich ist.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zur Bestimmung der Ausgangskonzentration der Template-DNA eine Reihe von
15 PCR's mit unterschiedlichen und bekannten Ausgangskonzentrationen derselben Nukleinsäuremoleküle, d.h. derselben Templatemoleküle, zur Kalibrierung durchgeführt. Vorzugsweise wird dabei der PCR-Zyklus, bei dem die durch die Amplifikation bewirkte Änderung der Masse an Oligonukleotiden messbar wird, als Maß für die Ausgangskonzentration der Template-Moleküle verwendet. Da die
20 Änderung der Masse an Oligonukleotiden im Verlauf der PCR-Reaktion eine sigmoide Funktion, umfassend einen exponentiellen Anstieg und eine Sättigungsphase, darstellt, kann dieser Startzyklus n_s beispielsweise derart ermittelt werden, dass der Wendepunkt der sigmoiden Funktion bestimmt wird und eine Tangente an die Funktion durch diesen Wendepunkt gelegt wird. Der Schnittpunkt
25 dieser Tangente mit x-Achse (siehe Abb. 1) ergibt den Startzyklus n_s . Der Wendepunkt wird durch Bestimmung des Maximums der ersten Ableitung der sigmoiden Funktion erhalten.

Alternativ kann der Startzyklus n_s auch ermittelt werden, indem die Scheitelpunkte
30 der sigmoiden Funktion, d.h. die Maxima der zweiten Ableitung der sigmoiden

- 18 -

Funktion, bestimmt werden und durch eine Gerade miteinander verbunden werden. Wiederum ergibt der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse den Startzyklus n_s .

- 5 Folglich kann der auf die vorstehend beschriebene Weise ermittelte Startzyklus n_s eine reelle Zahl sein.

- Auf dieselbe Weise wird der Startzyklus n_s für die Probe mit unbekannter Konzentration ermittelt. Durch Regressions- und Interpolationsrechnung erhält man
10 somit die Startkonzentration ct_0 der Template-DNA.

- Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird nach Beendigung der PCR die Temperatur bestimmt, bei der sich die Oligonukleotide von der Oberfläche ablösen. Auf diese Weise können Aussagen über
15 die spezifische Natur der PCR-Produkte, insbesondere den GC-Gehalt der amplifizierten Nukleinsäuremoleküle, erhalten werden. Beispielsweise kann im Anschluss an die PCR eine sukzessive Erhöhung der Temperatur durchgeführt werden und dabei die Abschmelztemperatur der Oligonukleotide von Oligonukleotidsonden auf der Oberfläche gemessen werden.

20

Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Vorrichtung zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Nukleinsäuremolekülen bereitgestellt.

- 25 Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst eine Reaktionskammer, in der die PCR durchgeführt wird; eine Einheit zur Steuerung der Temperatur; eine Oberfläche, die zur Bindung von Oligonukleotiden geeignet ist; sowie einen Detektor zur Bestimmung der Masse an auf der Oberfläche gebundenen Oligonukleotiden.

Unter Bindung an eine Oberfläche wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung jede mögliche Art von Wechselwirkung der Oligonukleotide mit einer Oberfläche verstanden, die dazu geeignet ist, die Bindung auf der Oberfläche massensensitiv zu bestimmen.

5

Vorzugsweise befindet sich die Oberfläche auf dem Detektor zur Bestimmung der Masse der auf der Oberfläche gebundenen Oligonukleotide. In dieser Ausführungsform wird die Oberfläche im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch als Sensorfläche bezeichnet.

10

Als Oberfläche bzw. Sensorfläche eignet sich grundsätzlich nahezu jeder Oberflächentyp. Wie in V. Chan et al., Effect of Hydrophobicity and Electrostatics on Adsorption and Surface Diffusion of DNA Oligonucleotides at Liquid/Solid Interfaces, Journal of Colloid and Interface Science 203, 197 – 207 (1998),

15 beschrieben, binden bzw. adsorbieren Oligonukleotide an fast jede Oberfläche unspezifisch.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform bindet die Oberfläche Oligonukleotide unspezifisch, d.h. unabhängig davon, ob es sich um Oligonukleotidprimer oder um
20 üblicherweise wesentlich längere Template-DNA bzw. Target-DNA handelt. Ferner ist es bevorzugt, dass die Oberfläche die Oligonukleotidprimer und Template-DNA bzw. Target-DNA mit ähnlicher Affinität bindet.

Bei einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Bindung
25 von amplifizierten Nukleinsäuremolekülen gegenüber der Bindung von Oligonukleotidprimern auf der Oberfläche bevorzugt. In dieser Ausführungsform wird pro PCR-Zyklus eine größere Änderung in der Masse an Oligonukleotiden beobachtet, da der Einfluss der Primerkonzentration geringer ist, bzw., falls die Oligonukleotidprimer nicht an die Oberfläche binden, die Masse der
30 Oligonukleotidprimer nicht detektiert wird.

- 20 -

Ferner ist es bevorzugt, dass die Oberfläche keine Desoxyribonukleotidtriphosphate bindet.

- 5 Ferner sind bei einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung Bindungsstellen für die Oligonukleotide auf der Oberfläche gleichmäßig verteilt. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass alle Oligonukleotide mit gleicher Wahrscheinlichkeit an die Oberfläche binden.
- 10 Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Anzahl an Bindungsstellen für die Oligonukleotide auf der Oberfläche größer als die Anzahl an Oligonukleotiden. Dies hat den Vorteil, dass alle Oligonukleotide auf der Oberfläche binden können und somit vergleichbare Massenwerte pro PCR-Zyklus bestimmt werden können.
- 15 Als besonders vorteilhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung hat sich eine Oberfläche erwiesen, bei der die Bindungsstellen auf der Oberfläche angebrachte Oligonukleotidsonden sind, die zur Hybridisierung mit den zu amplifizierenden Nukleinsäuremolekülen, d.h. den Target- und Template-
- 20 Nukleotidsequenzen, und/oder den Oligonukleotid-Primern geeignet sind.
- Dabei ist es besonders bevorzugt, dass alle Oligonukleotidsonden dieselbe Länge aufweisen.
- 25 Des Weiteren ist es bevorzugt, dass die Oligonukleotidsonden kombinatorisch auf der Oberfläche erzeugt werden. Eine Oberfläche bzw. Sensorfläche, auf der sämtliche kombinatorisch erzeugbaren Oligonukleotide einer festen Länge gleich verteilt gebunden sind, wird im Folgenden als Universaloligo-Sensorfläche (UvOS)-Fläche bezeichnet. Zur Herstellung einer derartigen UvOS-Fläche wird
- 30 beispielsweise im Fall eines Glaschips als Träger für die Sensorfläche die

- Glasoberfläche mit 3-Glycidoxypropyltrimetoxysilan (GOPS) silanisiert (siehe U. Maskos, E.M. Southern, Nucleic Acid Research 1992, 20, 1679), das Epoxid geöffnet und mit Pentaethylenglykol verestert. Anschließend werden mit Hilfe der Phosphoramiditchemie (M.J. Gait, Oligonucleotide Synthesis: A practical Approach; IRL Press at Oxford University Press, 1990) oberflächengebundene Oligonukleotide auf die Oberfläche synthetisiert. Dabei werden mit jedem Syntheseschritt alle vier Basen (A, G, C und T) gleichzeitig gekoppelt. Auf diese Weise erhält man nach dem zweiten Schritt alle möglichen 2-mere, d.h. 16 verschiedene Oligonukleotide, gleich verteilt auf der Oberfläche. Nach dem dritten Schritt erhält man alle möglichen 3-mere (4^3) und nach dem n-ten Schritt erhält man alle möglichen n-mere (4^n) auf der Oberfläche bzw. Sensorfläche. Auf diese Weise wird für jedes denkbare Oligonukleotid eine hybridisierungsfähige Sonde auf der UvOS-Fläche erzeugt. Ein derartiges Verfahren wird als kombinatorische Synthese bezeichnet.
- 15 An eine derartige UvOS-Fläche kann jedes sich in der Amplifikationslösung befindende Oligonukleotid binden bzw. hybridisieren. Eine UvOS-Fläche als Sensorfläche erfüllt damit alle Anforderungen, die an einen qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von in einer PCR amplifizierten Nukleinsäuremolekülen durch Bestimmung der Masse der auf der Oberfläche gebundenen Oligonukleotide gestellt werden.
- 20

- Bei derartigen UvOS-Flächen ist die Hybridisierungstemperatur von wesentlicher Bedeutung. Je tiefer die Temperatur ist, desto besser sind die Bindungen der Oligonukleotide an die Oberfläche. Dagegen wird bei höheren Temperaturen wie z.B. einer Denaturierungstemperatur von etwa 95°C bei der PCR, jegliche DNA-DNA-Wechselwirkung reversibel aufgeschmolzen. Somit lässt sich bei der Denaturierungstemperatur ein Nullwert bzw. Bezugswert für die Bestimmung der Massenänderung bei jedem PCR-Zyklus messen. Für die Bestimmung der Masse der an die Oberfläche gebundenen Oligonukleotide kann es vorteilhaft sein, die
- 25

- 22 -

Temperatur unter die Annealingtemperatur zu senken, um die Empfindlichkeit des Nachweises zu steigern.

5 Ferner zeichnen sich bevorzugte Oberflächen bzw. Sensorflächen dadurch aus, dass sie längere DNA-Moleküle besser binden als kürzere. D.h., es werden Template-DNA-Moleküle bzw. Target-DNA-Moleküle besser gebunden als die kürzeren Oligonukleotidprimer. Auf diese Weise verbessert sich das Signal des Nachweises der Amplifizierung von Target-DNA über die Massenänderung.

10 Um eine Veränderung der Primer- und Target-Konzentration während der Annealingphase durch Bindung an die Oberfläche bzw. Sensorfläche möglichst gering zu halten, ist es des Weiteren bevorzugt, dass das Verhältnis von Sensoroberfläche zu Reaktionskammervolumen möglichst klein gehalten wird. Bevorzugte Werte für das Verhältnis von Oberfläche zu Kammervolumen sind im
15 Bereich von $10^{-1} \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ bis $10^{-3} \text{ mm}^2/\mu\text{l}$, besonders bevorzugt $5 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ bis $5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ und am meisten bevorzugt etwa $0,02 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$.

Bevorzugte Detektoren für die Bestimmung der Masse der auf der Oberfläche gebundenen Oligonukleotide wurden bereits vorstehend beschrieben und sind
20 vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Weißlichtinterferometer, einem Oberflächenwellensensor, einer Mikrowaage, einem Quarzkristall-Microbalance-Dissipation-Sensor sowie einem Sensor zur Detektion von Oberflächenplasmonenresonanz.

25 Falls beispielsweise die Bestimmung der Masse mittels eines Weißlichtinterferometers erfolgt, ist es vorteilhaft, wenn die Oberfläche der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine für die Interferometrie geeignete Dicke vorzugsweise im Bereich von 300 nm bis 700 nm, besonders bevorzugt im Bereich 400 nm bis 600 nm und am meisten bevorzugt von etwa 500 nm aufweist.

- 23 -

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Vorrichtung zusätzlich einen Steuerrechner, der die Messdaten aufzeichnet und/oder die Temperatursteuerung sowie den Detektor kontrolliert.

- 5 Ferner ist es bevorzugt, dass die erfindungsgemäße Vorrichtung zusätzlich einen Einlass bzw. Auslass für die zu amplifizierenden Proben bzw. amplifizierten Proben umfasst.

- 10 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

- 15 Durch die vorliegende Erfindung wird somit ein Sensorsystem zum Molekulargewichts-spezifischen Nachweis von Oligonukleotiden bereitgestellt, das die massenspezifische Detektion von Oligonukleotiden gewährleistet. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum spezifischen in situ-Nachweis von PCR-Produkten. Auf Grund der Möglichkeit, mit dem vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren bzw. mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung sowohl die Ausbeute an PCR-Produkten als auch die Basenlänge und
20 damit das Molekulargewicht der PCR-Produkte zu messen, werden übliche zeitaufwendige Analyseschritte wie beispielsweise eine elektrophoretische Aufarbeitung der Produkte, bei der DNA nach ihrer Größe durch Migration in einer Gelmatrix aufgetrennt werden, überflüssig. Durch die Möglichkeit der online-Detektion kann ferner die Zyklenzahl mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens
25 bzw. der erfindungsgemäßen Vorrichtung auf eine für eine gewünschte Menge an PCR-Produkt erforderliche Anzahl an Zyklen beschränkt werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch das nachfolgende Ausführungsbeispiel beschrieben, das allerdings nicht als beschränkend ausgelegt werden soll.

Beispiel:

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, in diesem Beispiel als SMO-PCR (1) bezeichnet, umfasst in diesem Beispiel ein Weißlicht-Interferometer (200), mit dem die Schichtveränderungen in der Sensoroberfläche (121) der PCR-Sensorzelle (100) gemessen werden (siehe Abbildung 4). Ein Steuerrechner (300) zeichnet die Messdaten über die Steuerleitung (302) auf. Des Weiteren regelt und kontrolliert der Steuerrechner über die Steuerleitungen (301, 303) die Temperatursteuerung (400) sowie die Weißlichtquelle (201).

10

Aufbau der PCR-Sensorzelle (100)

In WO 01/02094 wird eine miniaturisierte PCR-Kammer beschrieben, die durch Einsetzen eines Sensorchips (1) gemäß der vorliegenden Erfindung anstelle des in WO 01/02094 verwendeten Chips im Sinne des erfindungsgemäßen Sensorsystems verwendet werden kann (siehe Abbildung 5). Auf die Offenbarung der WO 01/02094 wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

15

Die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. die PCR-Sensorzelle (100) besteht aus einem Gehäuse (110), in der sich eine Kammer (114) befindet, die über einen Auslass (112) und einen Einlass (111) mit Probenlösung entleert und befüllt werden kann. Die Kammer (114) verfügt über einen Lichteintrittskegel (115), um die Wechselwirkungen an der Sensoroberfläche (121) mit einem Weißlicht-Interferometer (200) messen zu können. Der Lichteintrittskegel (115) wird durch den Sensorchip (120) verschlossen. Die Unterseite der Kammer (114) wird mit einer Heizeinheit (130) verklebt und abgedeckelt. Mit der Heizeinheit (130) kann die Probenlösung exakt temperiert werden. Eine Heizeinheit ist in WO 01/02094 beschrieben. Das Verhalten der Flüssigkeit sowie die Sicherstellung der Benetzung der Sensorfläche (121) ist ebenfalls in WO 01/02094 beschrieben.

20

25

30

Aufbau des Weißlicht-Interferometers (200)

Das Weißlicht-Interferometer (200), wie es z.B. käuflich bei der Firma
,Ingenieurbüro für Angewandte Spektrometrie', Röntgenstraße 33, D-73431 Aalen
zu erhalten ist, besteht aus einer Weißlichtquelle (201), deren Licht über einen
5 Lichtwellenleiter (210) auf eine fokussierende Vorsatzoptik (220) gelangt. Durch die
fokussierende Vorsatzoptik (220) wird das Licht auf die Sensorfläche (121)
fokussiert. Die von der Sensorfläche (121) reflektierten Lichtstrahlen (230) werden
durch die fokussierende Vorsatzoptik (220) in den zweiarmigen Y-Lichtwellenleiter
(210) eingekoppelt. Das reflektierte Licht gelangt in das Diodenarray-Spektrometer
10 (202) und wird ausgewertet, indem die Lichtintensität des reflektierten Lichtes in
Abhängigkeit von der Wellenlänge gemessen wird.

Sensorchip (120)

Der Sensorchip (120) besteht aus Glas, auf dem ein dreidimensionales SiO₂-
15 Netzwerk über Sol-Gel-Technik (C. J. Brinker, G. W. Scherer, Sol-gel science : The
physics and chemistry of sol-gel processing; Boston [u.a.] : Academic Press, 1990)
aufgebracht wurde, das als Sensorfläche (121) dient. Das Sol-Gel ist etwa 500 nm
stark. Es ist mit Glycidoxypentylgruppen modifiziert, an die über Pentaethylenglykol
Oligonukleotide synthetisiert werden. Die Oligonukleotidsynthese wird
20 kombinatorisch durchgeführt. Durch diesen Herstellungsweg wird eine mit 500 nm
ziemlich dicke und damit für die Weißlicht-Interferometrie geeignete UvOS-Fläche
erhalten. Der Brechungsindex liegt bei etwa 1,4.

Durch Hybridisierung von Oligonukleotiden ändert sich das Produkt aus
25 Brechungsindex und Schichtdicke um etwa 10 nm. Diese Änderung ist schematisch
in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt. Dort ist auch der Strahlengang des
Weißlicht-Interferometers (200) skizziert. Der einfallende Weißlichtstrahl (231) wird
an den Grenzflächen Sensorchip (120) und Sensorfläche (121) sowie Sensorfläche
(121) und Kammer (114) reflektiert. Die Reflexionen 1. Ordnung (233) und
30 2. Ordnung (234) zeigen beim Austreten aus dem Sensorchip (120) eine leichte

Phasenverschiebung (235). Durch Bindung (Hybridisierung) von Oligonukleotiden wird die Sensorfläche (121) im Allgemeinen dicker. Dadurch wird die Phasendifferenz (235) beim Übergang von der unbeladenen Sensorfläche (122) (siehe Abbildung 8) zur beladenen Sensorfläche (123) (siehe Abbildung 9) größer.

- 5 Jedoch ist die Änderung der Schichtdicke zu klein, um die Phasendifferenz direkt interferometrisch messen zu können. Daher wird das austretende Licht durch ein Diodenarray-Spektrometer (202) spektral zerlegt und damit die Lichtintensität gegen die Wellenlänge gemessen (siehe Abbildung 2).

10 Weißlicht-Interferometersignal

Das Interferenzsignal zeigt in Abhängigkeit der Wellenlänge Auslöschungen und Verstärkungen (siehe Abbildung 2). Aus der Verschiebung zweier Spektren lässt sich das Produkt aus Schichtdickenänderung Δd und Brechungsindexdifferenz Δn der Sensorfläche (121) von einer Messung zur nächsten ermitteln (Peak-zu-Peak-

- 15 Abstand). Es wird zunächst bei der Denaturierungstemperatur von 95 °C und anschließend bei der Annealingtemperatur von 65°C gemessen. Danach werden die Mittelwerte der Abstände der Minima und Maxima aus den Weißlicht-Interferometerspektren ermittelt. Man erhält damit für jeden PCR-Zyklus als Messwert das Produkt aus Schichtdickenänderung Δd und Brechungsindexdifferenz Δn zwischen der unbeladenen Sensorfläche bei 95 °C und der beladenen Sensorfläche bei 65 °C. In Abbildung 3 ist ein entsprechendes Beispiel dargestellt.

Datenauswertung (300)

- Ein Steuerrechner (300) koordiniert über ein Softwareprogramm die Ansteuerung der Weißlichtquelle (201), der Temperaturregung (400) für die PCR und das Auslesen
25 der Messdaten des Diodenarray-Spektrometers (202). Ein Rechenprogramm ermittelt aus den Messdaten des Diodenarray-Spektrometers (202) den Messwert M für jeden PCR-Zyklus (siehe Abbildung 3). Aus der Änderung von M mit jedem PCR-Zyklus lässt sich die Amplifikation pro PCR-Zyklus erkennen. Ein starker Anstieg des

- 27 -

Messwertes M weist auf eine erfolgreiche Verstärkung hin. Die Messung kann abgebrochen werden. Aus den erhaltenen Messwertpaaren lässt sich die Länge l_t und der Verstärkungsfaktor v der PCR annähernd ermitteln. Dazu wird zunächst der Mittelwert aller Messungen M_{start} , bei denen noch keine Amplifikation nachweisbar
5 ist von den übrigen Messungen M_n abgezogen:

$$M'_n = M_n - M_{\text{start}}$$

Es werden Messwerte M'_n erhalten. Die so erhaltenen Messwertpaare werden
10 logarithmiert und dann durch lineare Regression die Koeffizienten aus der Gleichung

$$\log(M'_n) = a \cdot n + b$$

ermittelt. Daraus lässt sich die PCR-Produktlänge l_t und der Verstärkungsfaktor v
15 folgendermaßen berechnen:

$$v = \exp(a),$$

$$l_t = \exp(b) / E \cdot ct_0 \cdot MB$$

20

worin E die Systemkonstante der Messapparatur ist. Für die in Abbildung 3 dargestellten Kurven werden für die Targetlänge l_t -Werte von 170 (theor. 200) bzw. 470 bp (theor. 500) erhalten.

25 Die Startkonzentration des Targets ct_0 wird durch eine Kalibrationsmessung erhalten. Es werden mehrere Polymerase-Kettenreaktionen mit demselben Template unterschiedlicher, aber bekannter Startkonzentration vermessen. Für jede PCR wird der Startzyklus n_s ermittelt, ab dem die Amplifikation messbar wird. Da der Startzyklus durch Extrapolationsrechnung erhalten wird, ist n_s eine reelle und keine
30 natürliche Zahl. Genauso wird der Startzyklus von der Probe mit unbekannter

Konzentration ermittelt. Durch Regressions- und Interpolationsrechnung erhält man daraus die Startkonzentration ct_0 .

Abbildungen

5

Abbildung 1:

Die Masse bzw. Massenkonzentration mc_n an Oligonucleotiden in der Amplifikationslösung wird in Abhängigkeit der Zahl der PCR-Zyklen n für zwei verschiedene Targetlängen (500 Basenpaare und 200 Basenpaare) dargestellt.

10

Abbildung 2:

Weißlicht-Interferenzsignale werden in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt. Die Signale sind auf Werte zwischen 0 und 1 normiert. Deutlich wird die Verschiebung des Signals durch die Änderung der Beladung der Sensorfläche (121) mit dem Target.

15

Abbildung 3:

Der mit Weißlichtinterferometrie erhaltene Messwert M als Produkt aus Schichtdickendifferenz Δd und Brechungsindexdifferenz Δn wird in Abhängigkeit von der PCR-Zykluszahl n für zwei verschiedene Targetlängen (500 Basenpaare und 200 Basenpaare) dargestellt.

20

Abbildung 4:

Schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in Form eines SMO-PCR-Gesamtaufbaus (1) bestehend aus Steuerrechner (300), Weißlicht-Interferometer (200), PCR-Sensorzelle (100) und Temperatursteu-
erung (400).

25

Abbildung 5:

Schematische Darstellung der PCR-Sensorzelle (1) bestehend aus Gehäuse (110), Einlass (111), Auslass (112), Sensorchip (120) und Reaktionskammer (114).

30

Abbildung 6:

Schematische Darstellung der PCR-Sensorzelle (1) entlang der Schnittlinie A-A mit angeklebter Heizeinheit (130).

5

Abbildung 7:

Schematische Darstellung der PCR-Sensorzelle (1) mit Lichteintrittskegel (115) von oben.

10 Abbildung 8:

Schematische Darstellung des Sensorchips (120) mit unbeladener Sensorfläche (122) und dem Strahlengang bestehend aus einstrahlendem Weißlicht (231) von der Weißlichtquelle (201), der Reflexion 1. Ordnung (233) und der Reflexion 2. Ordnung (234). Anhand der Abbildung wird die wellenlängenabhängige Phasenverschiebung zwischen der Reflexion 1. Ordnung (233) und der Reflexion 2. Ordnung (234) deutlich.

15

Abbildung 9:

Schematische Darstellung des Sensorchips (120) mit beladener Sensorfläche (123) .

20

Im Vergleich mit Abbildung 8 wird die Änderung der wellenlängenabhängigen Phasenverschiebung in Abhängigkeit der Beladung deutlich. Es sei darauf hingewiesen, dass sich diese Phasenverschiebung nicht direkt messen lässt, da sie mit einer Längenänderung von ca. 10 nm zu klein ist. Daher muss das reflektierte Licht spektral zerlegt werden.

25

- 30 -

A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von in einer
5 Amplifikationsreaktion, insbesondere einer Polymerase-Kettenreaktion,
amplifizierten Nukleinsäuremolekülen,
dadurch gekennzeichnet, dass die Änderung der Masse an Oligonukleotiden in
einer Amplifikationslösung während der Amplifikationsreaktion, insbesondere der
Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bestimmt wird.
- 10
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Änderung der Masse an
Oligonukleotiden während der PCR durch Bestimmung der Masse an bei einem
PCR-Zyklus vorliegenden Oligonukleotiden bei mindestens zwei PCR-Zyklen,
15 vorzugsweise bei jedem PCR-Zyklus erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-
Zyklus vorliegenden Oligonukleotiden durch Bestimmung der Masse an
20 Oligonukleotiden erfolgt, die an eine Oberfläche binden.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung der Oligonukleotide an die Oberfläche
reversibel erfolgt.
- 25
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,
dadurch gekennzeichnet, dass bei der PCR als Monomere eingesetzte
Desoxyribonukleotidtriphosphate nicht an die Oberfläche binden.

- 31 -

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Änderung der Masse an
Oligonukleotiden in situ erfolgt.

5 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Änderung der Masse an
Oligonukleotiden durch einen massensensitiven Detektor, vorzugsweise ausgewählt
aus der Gruppe, bestehend aus einem Weißlichtinterferometer, einem
Oberflächenwellensensor, einer Mikrowaage, einem Quarzkristall-Microbalance-
10 Dissipation-Sensor und einem Sensor zur Detektion von
Oberflächenplasmonenresonanz, erfolgt.

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, umfassend die
folgenden Schritte:
15 a) Denaturierung von DNA-Doppelsträngen durch Einstellung einer
geeigneten Temperatur (Denaturierungstemperatur);
b) Annealing der Oligonukleotidprimer an die zu amplifizierenden
Nukleinsäuremoleküle durch Einstellung einer geeigneten Temperatur
(Annealingtemperatur);
20 c) DNA-Synthese bzw. Kettenverlängerung bei einer geeigneten Temperatur
(Kettenverlängerungstemperatur);
d) ggf. Wiederholung der Schritte a) bis c),
wobei die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-Zyklus vorliegenden
Oligonukleotiden nach Schritt b) und/oder nach Schritt c) erfolgen kann.

25

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, dass sich die an der Oberfläche gebundenen
Oligonukleotide bei der Denaturierungstemperatur von der Oberfläche ablösen.

30

- 32 -

10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass bei der Denaturierungstemperatur ein Messwert
bestimmt wird, der als Nullwert für die bestimmte Masse an bei einem PCR-Zyklus
vorliegenden Oligonukleotiden dient.

5

11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-
Zyklus vorliegenden Oligonukleotiden bei der Annealing-Temperatur erfolgt.

10

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Masse an bei einem PCR-
Zyklus vorliegenden Oligonukleotiden bei einer Temperatur unterhalb der
Annealing-Temperatur, vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von 25°C bis
50°C und besonders bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 30°C bis 40°C
erfolgt.

15

13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass aus der Änderung der Masse an Oligonukleotiden
während der PCR das Molekulargewicht der amplifizierten Nukleinsäuremoleküle
bestimmt wird.

20

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass aus der Änderung der Masse an Oligonukleotiden
während der PCR der Verstärkungsfaktor der PCR bestimmt wird.

25

15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung der Ausgangskonzentration der zu
amplifizierenden Nukleinsäuremoleküle vor der PCR eine Reihe von Polymerase-
Kettenreaktionen mit unterschiedlichen und bekannten Ausgangskonzentrationen
derselben Nukleinsäuremoleküle zur Kalibrierung durchgeführt werden.

30

- 33 -

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, dass der PCR-Zyklus, bei dem die durch die
Amplifikation bewirkte Änderung der Gesamtmasse an Oligonukleotiden messbar
5 wird, als Maß für die Ausgangskonzentration der zu amplifizierenden
Nukleinsäuremoleküle verwendet wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 16,
dadurch gekennzeichnet, dass nach Beendigung der PCR die Temperatur bestimmt
10 wird, bei der sich die Oligonukleotide von der Oberfläche ablösen.

18. Vorrichtung zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von in
einer PCR amplifizierten Nukleinsäuremolekülen, umfassend:

- a) eine Reaktionskammer;
- 15 b) eine Temperaturstuerungseinheit;
- c) eine Oberfläche, die zur Bindung von Oligonukleotiden geeignet ist; und
- d) einen Detektor zur Bestimmung der Masse an auf der Oberfläche
gebundenen Oligonukleotiden.

20 19. Vorrichtung nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche Oligonukleotide unspezifisch
und/oder mit ähnlicher Affinität bindet.

20. Vorrichtung nach Anspruch 18,
25 **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bindung von amplifizierten
Nukleinsäuremolekülen gegenüber der Bindung von Oligonukleotidprimern auf der
Oberfläche bevorzugt ist.

- 34 -

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche keine
Desoxyribonukleotidtriphosphate bindet.
- 5 22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 21,
dadurch gekennzeichnet, dass Bindungsstellen für die Oligonukleotide auf der
Oberfläche gleichmäßig verteilt sind.
- 10 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 22,
dadurch gekennzeichnet, dass Bindungsstellen auf der Oberfläche angebrachte
Oligonukleotidsonden sind, die zur Hybridisierung mit den zu amplifizierenden
Nukleinsäuremolekülen und/oder den Oligonukleotid-Primern geeignet sind.
- 15 24. Vorrichtung nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet, dass alle auf der Oberfläche angebrachten
Oligonukleotidsonden dieselbe Länge aufweisen.
- 20 25. Vorrichtung nach Anspruch 23 oder 24,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotidsonden kombinatorisch auf der
Oberfläche erzeugt worden sind.
- 25 26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 25,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche silanisiertes Glas umfasst.
- 25 27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 26,
dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche eine für die Interferometrie geeignete
Dicke, vorzugsweise im Bereich von 300 nm bis 700 nm, besonders bevorzugt im
Bereich 400 nm bis 600 nm und am meisten bevorzugt von etwa 500 nm aufweist.

- 35 -

28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 27,
dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl an Bindungsstellen für die
Oligonukleotide auf der Oberfläche größer ist als die Anzahl an Oligonukleotiden.

5 29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 28,
dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Oberfläche zu Kammervolumen
möglichst gering ist und vorzugsweise von $10^{-1} \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ bis $10^{-3} \text{ mm}^2/\mu\text{l}$, besonders
bevorzugt $5 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ bis $5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ und am meisten bevorzugt etwa
0,02 $\text{mm}^2/\mu\text{l}$ beträgt.

10

30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 29,
dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung zusätzlich einen Steuerrechner
umfasst, der die Messdaten aufzeichnet, und die Temperatursteuerung sowie den
Detektor kontrolliert.

15

31. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 30,
dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung zusätzlich einen Probeneinlass und
Probenauslass umfasst.

20

32. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 31,
dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor ausgewählt ist aus der Gruppe,
bestehend aus einem Weißlichtinterferometer, einem Oberflächenwellensensor, einer
Mikrowaage, einem Quarzkristall-Microbalance-Dissipation-Sensor und einem
Sensor zur Detektion von Oberflächenplasmonenresonanz.

25

33. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 18 bis 32 zur
Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17.

30

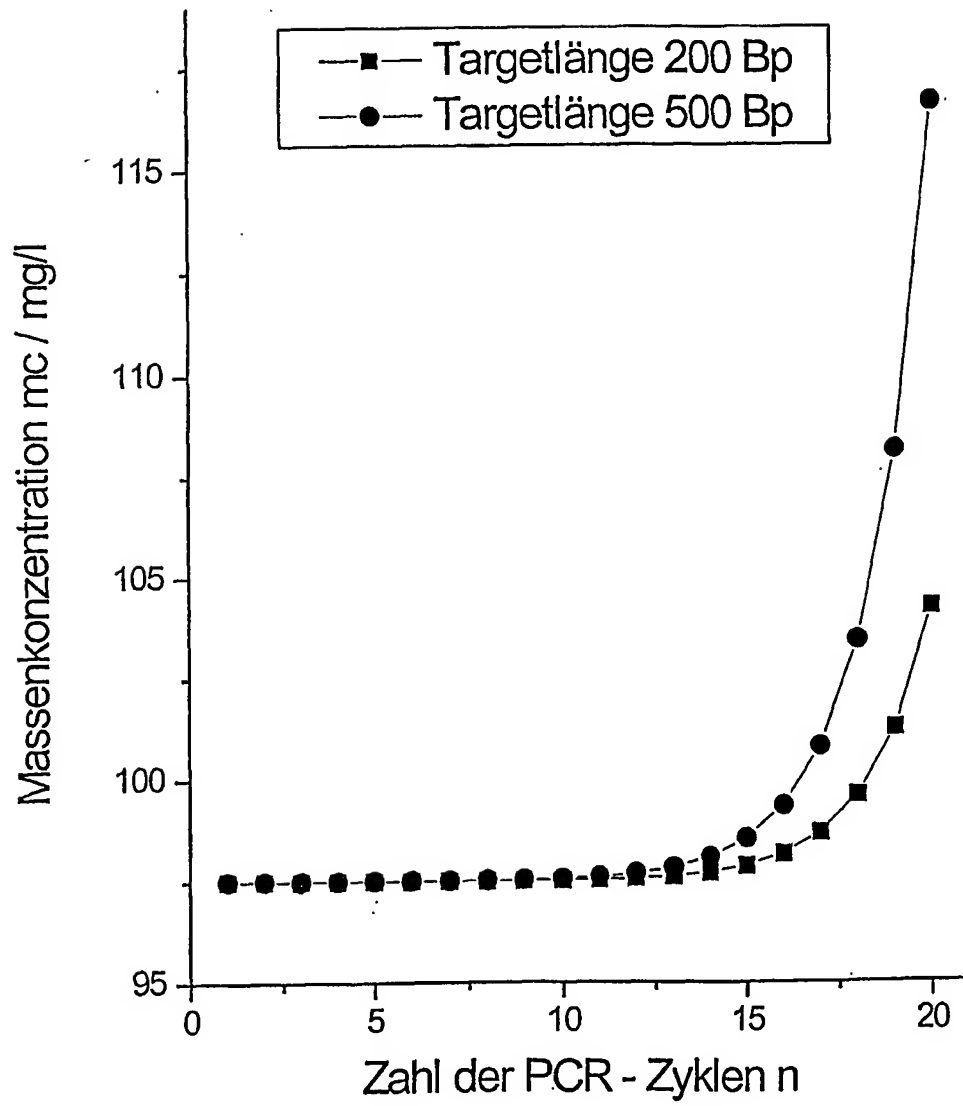


Abb. 1

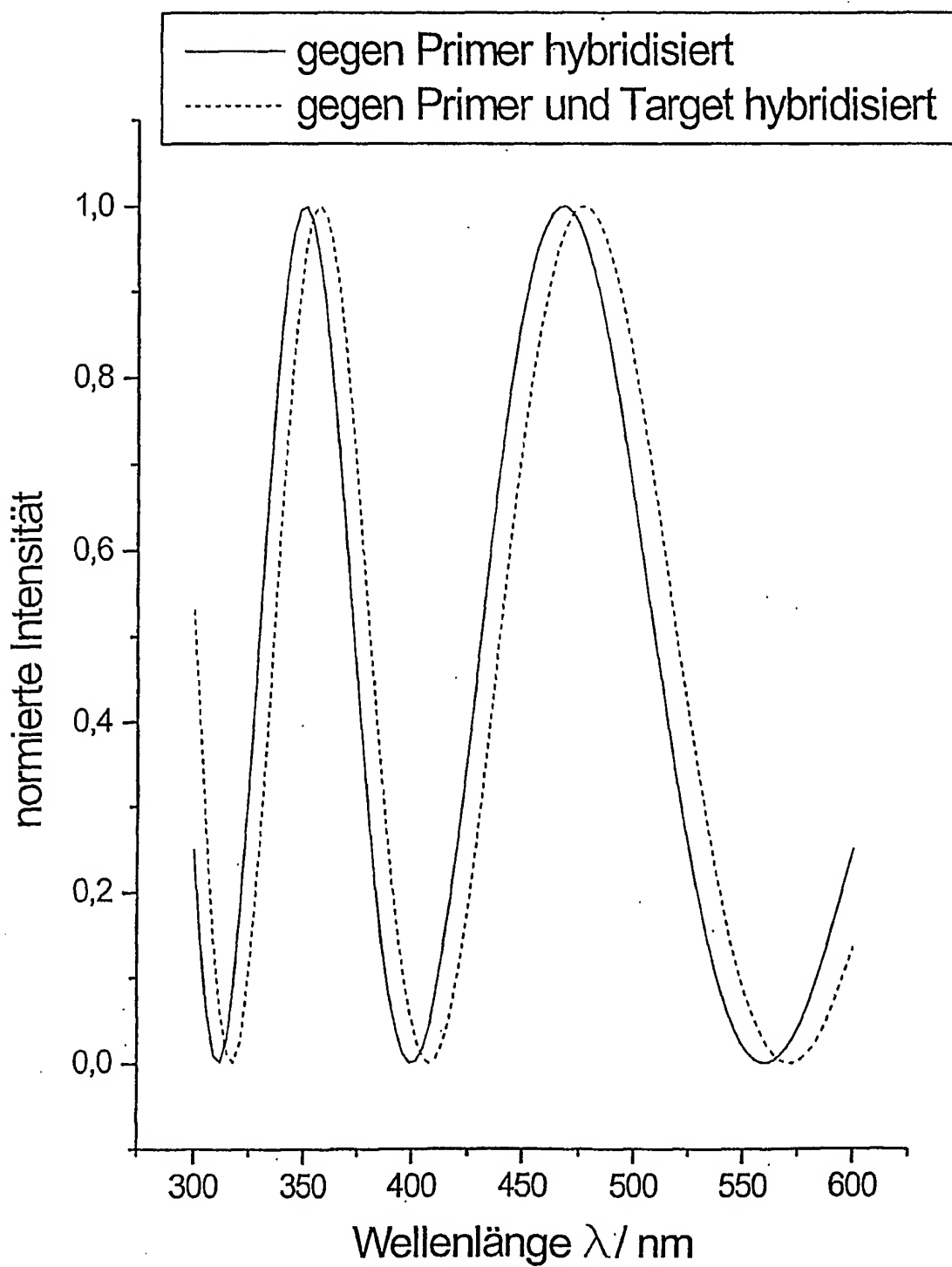


Abb. 2

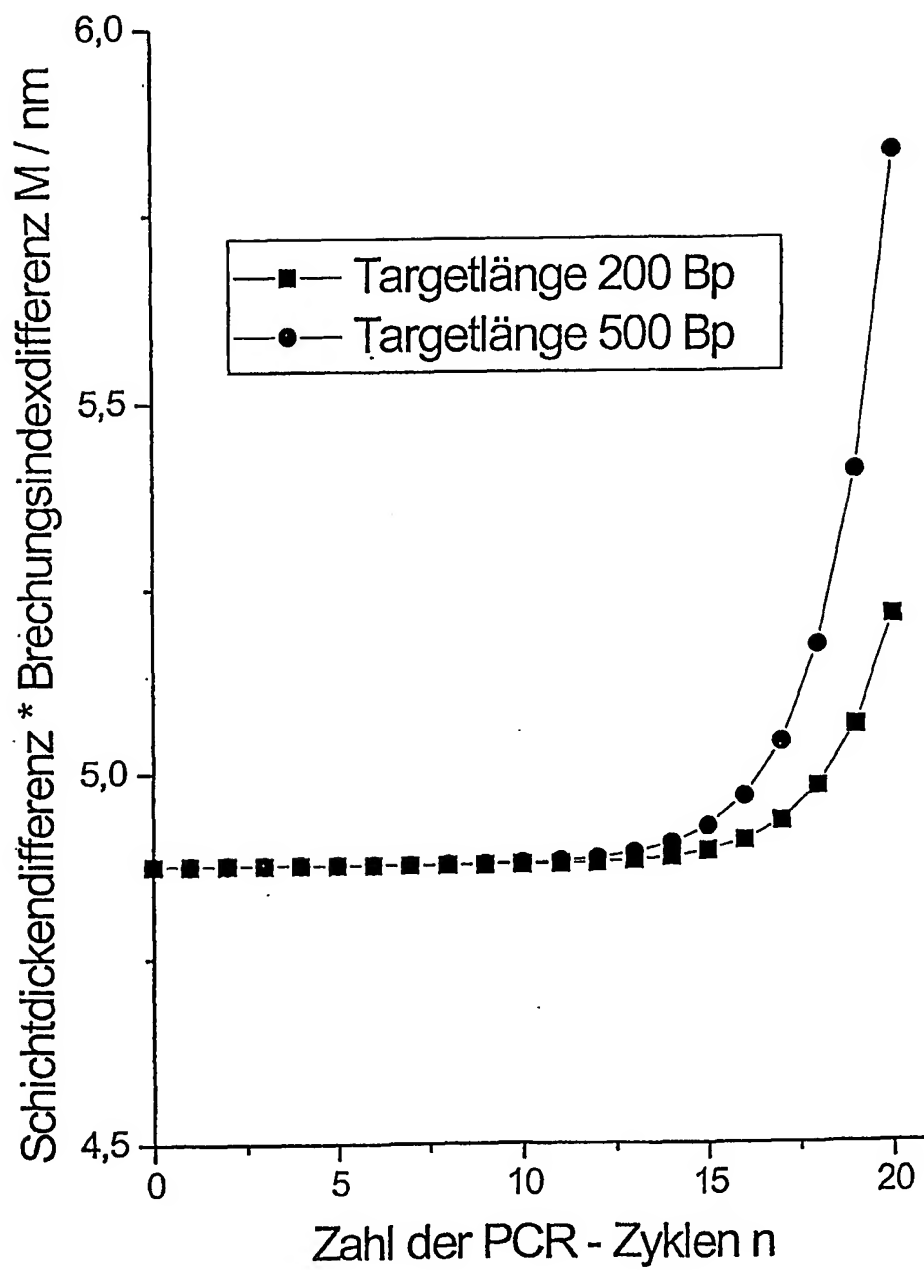


Abb. 3

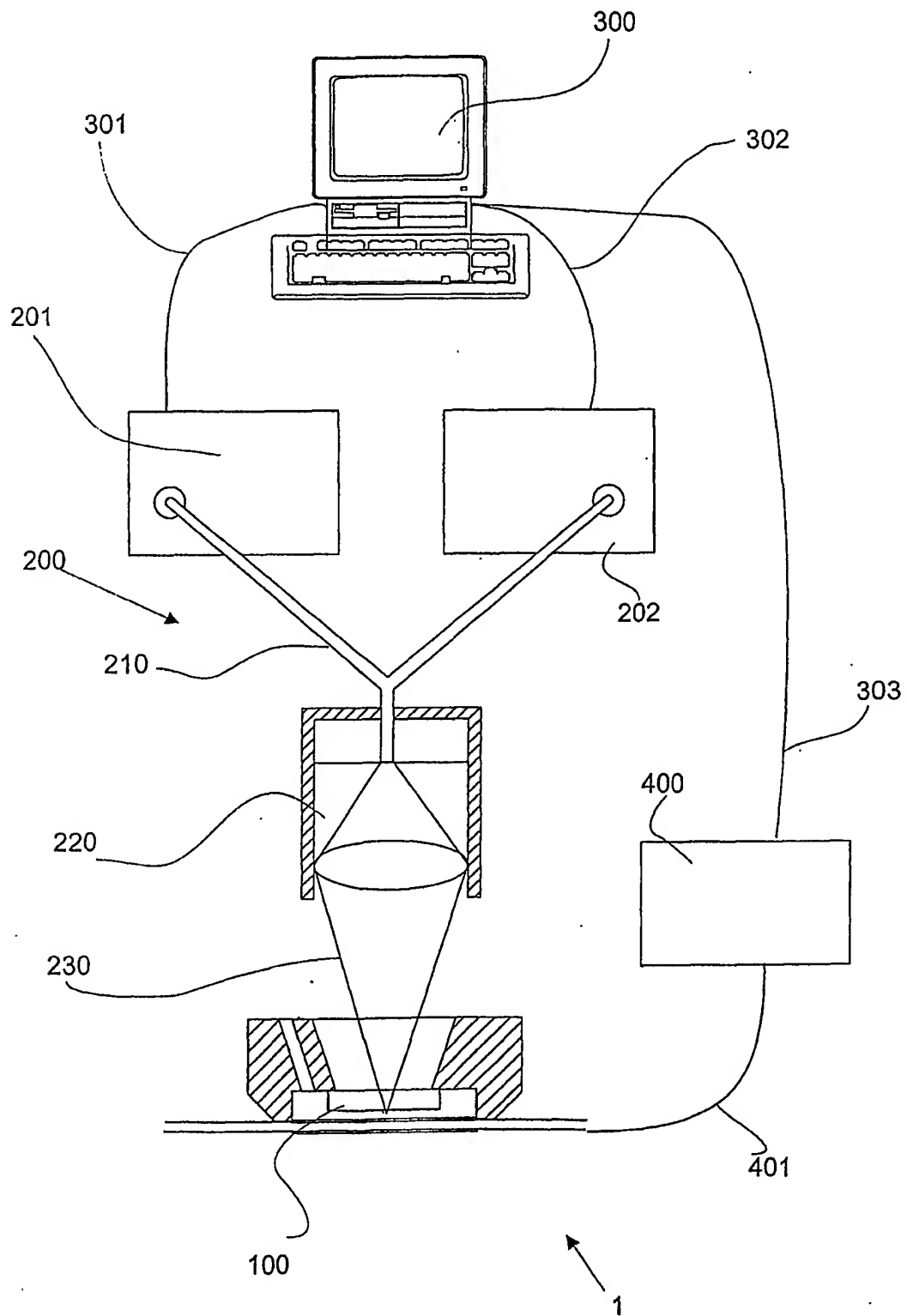


Abb. 4

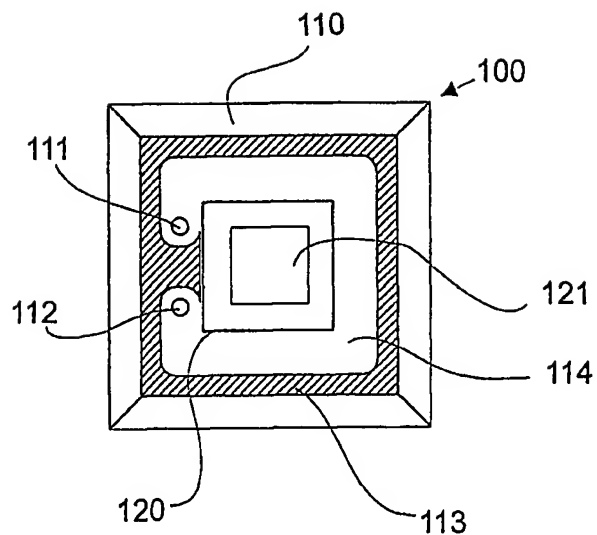


Abb. 5

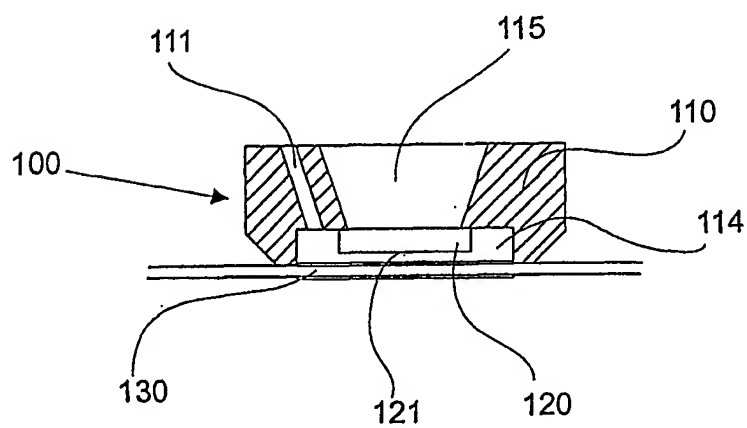


Abb. 6

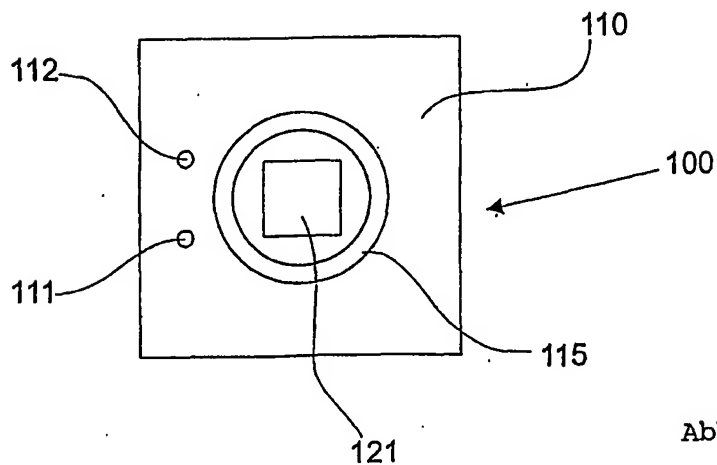


Abb. 7

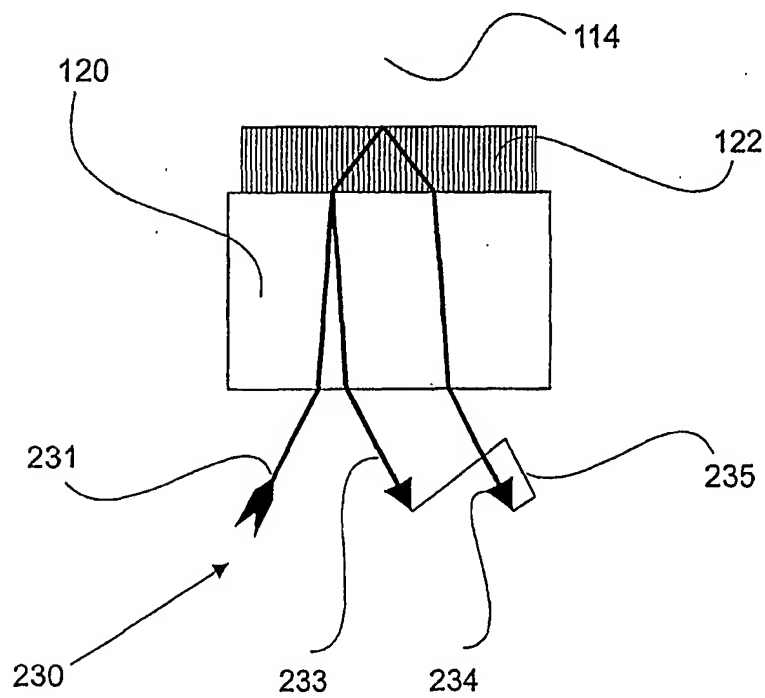


Abb. 8

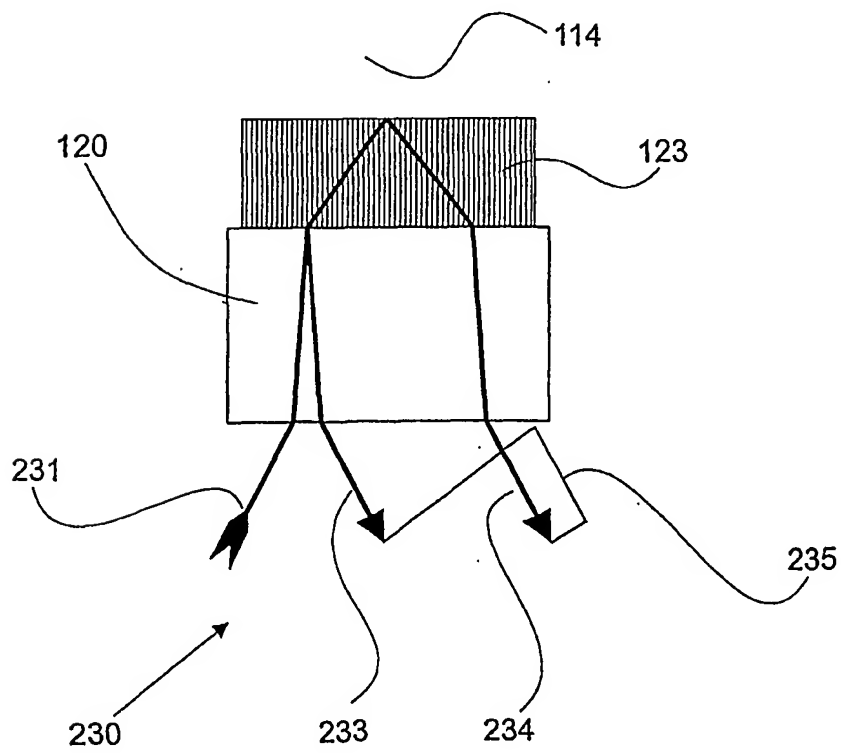


Abb. 9